

10/017777
PCT/JP99/04088
20.08.99

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/04088

REC'D 08 OCT 1999	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 5月31日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第151599号

出願人
Applicant(s):

和研薬株式会社

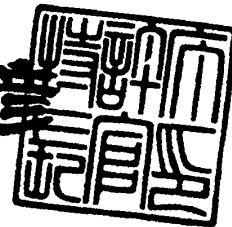
EK4

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3064156

【書類名】 特許願

【整理番号】 DP99-1036

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 21/00

【発明の名称】 連続無細胞タンパク質合成手段

【請求項の数】 16

【発明者】

 【住所又は居所】 愛媛県松山市朝美1丁目5番3号

 【氏名】 遠藤 弥重太

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県草津市下笠町字辻出945番地1 和研薬株式会社
社 草津センター内

 【氏名】 西川 茂道

【特許出願人】

 【識別番号】 591106680

 【氏名又は名称】 和研薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 067070

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 連続無細胞タンパク質合成手段

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己のタンパク質合成反応の阻害物質が実質的に排除された細胞抽出物からなる無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鋳型となる mRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入することを特徴とする連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 2】

合成反応の鋳型となる mRNA を、原料として添加した mRNA の鋳型活性が低下傾向を示す前後に追加添加することを特徴とする請求項 1 に記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 3】

エネルギー再生系酵素を、原料として添加したエネルギー再生系酵素活性が低下傾向を示す前後に追加添加することを特徴とする請求項 1 に記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 4】

エネルギー再生系酵素がクレアチンキナーゼである、請求項 3 に記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 5】

mRNA の追加添加量が、原料 mRNA 量の 10 分の 1 から同量である請求項 2 に記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 6】

エネルギー再生系酵素の追加添加量が、原料エネルギー再生系酵素量の 10 分の 1 から同量である請求項 3 又は 4 に記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 7】

mRNA の追加添加とエネルギー再生系酵素の追加添加が併用される請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 8】

mRNA の追加添加及び／又はエネルギー再生系酵素の追加添加が、継続的に
行われる請求項 1～7 のいずれかに記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 9】

基質、エネルギー源が、枯渇することを防ぐ工程及び／又は副生成物を排出す
る工程を導入した請求項 1～7 のいずれかに記載の連続無細胞タンパク質合成手
段。

【請求項 10】

前記請求項 9 に記載の工程が、透析外液の交換である請求項 9 に記載の連続無
細胞タンパク質合成手段。

【請求項 11】

追加・保存・交換・排出から選択される処置が自動制御された請求項 1～10
のいずれかに記載の連続無細胞タンパク質合成手段。

【請求項 12】

手段が、合成方法である請求項 1～11 のいずれかに記載の連続無細胞タンパ
ク質合成手段。

【請求項 13】

手段が、自動制御システムである請求項 11 に記載の連続無細胞タンパク質合
成手段。

【請求項 14】

手段が、装置である請求項 1～11 のいずれかに記載の連続無細胞タンパク質合
成手段。

【請求項 15】

手段が、試薬キットである請求項 1～11 のいずれかに記載の連続無細胞タンパ
ク質合成手段。

【請求項 16】

含浸槽とこれに密封可能に装着される蓋部とを含む構成からなる連続無細胞タン
パク質合成装置であって、該装置に基質及び／又はエネルギー源の導入手段であ
る入口と透析外液の含浸槽内の液室につながる出口をもつ流路、透析外液中の代

謝産物等の排出手段である含浸槽内の液室に存する入口と外部につながる出口をもつ流路、mRNA及び／又はエネルギー再生系酵素の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室に存する透析膜の機能を有する媒体を担持する装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、連続無細胞タンパク質合成手段に関する。さらに詳しくは、自己のタンパク質合成反応の阻害物質が実質的に排除された細胞抽出物からなる無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鑄型となるmRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素を追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入することを特徴とする連続無細胞タンパク質合成手段に係る。

【0002】

【従来の技術】

従来、無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の合成方法は、ペプチド合成反応速度と翻訳反応の正確性においては生細胞に匹敵する性能を保持しているものの、合成効率が生細胞のその0.1～1%以下と低く、反応時間も1時間以内と短いため、タンパク質の生産性が低いという欠点があった。

【0003】

今日、利用されている無細胞タンパク質合成系は、大腸菌、コムギ胚芽や家兎網状赤血球由来の系が主流で市販もされているが、いずれもタンパク質合成効率が低いという欠点から、放射性同位体標識法や免疫学的方法と組み合わせて遺伝子翻訳産物の分析手段としての利用に限られ、タンパク質の調製手段としては殆ど利用されていない。

【0004】

これまで、無細胞タンパク質合成系の効率化に関して多くの研究がなされてきたが、スピリン(A. S. Spirin)らは、従来の方法で調製した無細胞タンパク質合成系に、合成基質であるアミノ酸と、エネルギー源であるATP、GTPを限外ろ過膜を介して連続的に供給することによって(連続式無細胞タンバ

ク質合成系)、上記いずれの無細胞タンパク質合成系においても反応時間を20時間以上にわたって持続させることに成功し、従来の20倍を越えるタンパク質合成収量を達成した(Spirin, A. S. et al. (1988), Science, 242, 1162-1164)。

【0005】

一般に無細胞タンパク質合成反応液におけるリボソームなどタンパク質合成因子の濃度は、生細胞中に比べて10%前後と低い、横山らは濃縮した大腸菌抽出液を含む反応液と透析膜を用いる連続式無細胞タンパク質合成を試み、CATやRasなど比較的小分子のタンパク質を反応系1ml当たり3~6mgの高収量で合成することに成功している(木川ら、第21回日本分子生物学会、WID6)(Kigawa, T. et al. (1999), FEBS Lett. 442, 15-19)。

【0006】

これらの成果は、基質濃度の低下が、無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質合成効率の低下現象の一因であることを示している。言い換えると、連続式無細胞タンパク質合成系による効率化は、アミノ酸やエネルギー源の低下を防ぐ(反応中の基質濃度低下には、混在するそれら基質の代謝酵素群も関与すると考えられる)と同時に、AMPやGMP等の代謝産物及びリン酸やピロリン酸等の副生成物の蓄積を排出除去することにより、タンパク質合成効率が上昇した結果であると説明できる。

【0007】

従来の連続式無細胞タンパク質合成装置としては、限外ろ過膜法、透析膜法や樹脂に翻訳鑄型を固定化したカラムクロマト法等(Spirin, A. et al. (1993), Meth. in Enzymol., 217, 123-142)を挙げることができる。なかでも、限外ろ過膜法と透析膜法は取り扱いが簡便なため、汎用されている。本発明者等も、合成効率の高い無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を調製する方法を発明し、透析膜法をもちいた連続式無細胞タンパク質合成を試み、反応容量1ml当たり4mg程度のジヒドロ葉酸還元酵素の合成に成功している。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、限外ろ過膜法、透析膜法等によるアミノ酸やATP、GTP等のエネルギー源の連続的供給と、リン酸やピロリン酸等の副生成物の排出によって、無細胞系のタンパク質合成の効率化が達成されつつあるが、本発明者は、まだ次のような課題が残されていることを見出した。すなわち、(1) 反応溶液中の鋳型となるmRNAは不安定であり、長時間の反応では極微量混在するリボヌクレアーゼによる不可避的な消化によって鋳型活性が低下・消失する、(2) エネルギー再生系の酵素であるクレアチンキナーゼも長時間の反応中にその活性が低下し、エネルギー源の供給不足を来す、(3) 透析外液は反応液容量の10倍量程度を用いるが、長時間反応ではそれに含まれるアミノ酸やエネルギー源が枯渇すると同時に副生成物が蓄積する等である。したがって、このような新規な課題を解決する手段及びその具体化策として、これらのタンパク質合成に必須な成分の活性低下及び／又は原料の枯渇などに伴っておきる、タンパク質合成反応の低下もしくは停止を防ぐ手段を提供することが課題の一である。

【0009】

さらに、透析法による連続式無細胞タンパク質合成反応は、専用の反応装置が無い場合、反応温度制御、攪拌制御、透析外液交換、鋳型mRNA及びエネルギー再生系酵素であるクレアチンキナーゼ等のタンパク質合成反応液への添加などをすべて手動で行う必要がある。これらの操作は煩雑であり充分な経験と熟練した手技が必要とされ、本合成法の欠点となっている。この欠点を補う簡便で実用的な手段を提供することが課題の別の一である。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明は、自己のタンパク質合成反応の阻害物質が実質的に排除された細胞抽出物からなる無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鋳型となるmRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入することからなる。

【0011】

本発明の手段の一は、無細胞タンパク質合成系への、合成反応の鑄型となる mRNA の追加添加及び／又はエネルギー再生系酵素の追加添加によって達成される。

【0012】

本発明の別の手段の一は、無細胞タンパク質合成系において、基質・エネルギーの補給及び合成副生成物の排出によって達成される。

【0013】

本発明の別の手段の一は、無細胞タンパク質合成系に關与する要素の追加・保存・交換・排出を自動化して処理することによって達成される。

【0014】

本発明の別の手段の一は、無細胞タンパク質合成系に關与する要素の追加・保存・交換・排出が実施可能であり、かつ合成反応の温度制御、攪拌制御等の条件設定が可能な連続無細胞タンパク質合成装置を提供することによって達成される。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の連続式無細胞タンパク質合成手段について詳細に説明する。

【0016】

(細胞抽出物の説明)

本発明の連続式無細胞タンパク質合成系には、大腸菌、胚芽、家兎網状赤血球等の既知の無細胞タンパク質合成系が適用可能である。好ましい系は、胚芽であり、コムギ、大麦、いね、コーン、及びほうれん草等が利用できる。この原料は、自体公知の方法によって、無細胞タンパク質合成材料つまり無細胞タンパク質合成用細胞抽出物として調製される (Johnston, F. B. et al. (1957), Nature, 179, 160-161) が、より好ましくは、自己のタンパク質合成反応の阻害に關与する系が排除されていることである。

【0017】

無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の、自己のタンパク質合成反応の阻害物質を排除することとは、原料細胞自身が含有する又は保持する自己タンパク質の合

成を制御する手段を除くことを意味する。特に、本発明者が見出したリボソームに作用してその機能を抑制する物質の排除を意味する。

【0018】

原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質とは、例えば種子の胚乳に大量に局在することが知られている、リボソームの機能を抑制するトリチン (Massiah, A. J. and Hartely, M. R. (1995), *Planta*, 197, 633-640)、チオニンとよばれるシステインを多く含むタンパク質 (Brummer, J., Thole, H. and Kloppstech, K. (1994), *Eur. J. Biochem.*, 219, 425-433)、リボヌクレアーゼ (Matsushita, S., *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, No. 19, 1~) 等である。

【0019】

胚芽の単離段階で混入する、胚乳局在性の胚芽無細胞タンパク質合成抑制 (阻害) タンパク質の一群、たとえば、トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等を完全に胚芽試料から排除することによって、タンパク質合成活性の抑制を解除することができる。

【0020】

自己のタンパク質合成を抑制する物質を除くための有用な手段は、界面活性剤特に非イオン性の界面活性剤を用いて原料細胞を処理することである。非イオン性の界面活性剤であるかぎり、広く利用ができるが、好適なものとしては、ポリオキシエチレン誘導体である、ブリッジ (Brij)、トリトン (Triton)、ノニデット (Nonidet) NP-40、ツイーン (Tween) 等が例示される。なかでも、ノニデット (Nonidet) NP-40 が最適である。その添加量は、例えば 0.5% である。

【0021】

処理は、原料細胞を、例えばコムギ胚芽を使った場合、既知の手段でミル・浮選・篩の工程によって、胚芽抽出物を回収する。この胚芽抽出物に対して界面活性剤による洗浄を数回おこない、洗浄液が白濁しなくなるまで、洗浄を行う。こ

の処理は、超音波処理との組合せでおこなうことがより好ましく、より完全な効果をうることができる。かくして、本発明の合成系で使用される、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物が調製される。

【0022】

（合成反応の開始）

かくして調製された無細胞タンパク質合成用細胞抽出物は、所望により製剤化され、要時、既知の方法例えば Erickson 等の方法 (Erickson, A. H. et al. (1996), Meth. in Enzymol., 96, 38-50) によって反応に供せられる。反応に際しては、既知の方法に順じて、例えば合成基質、アミノ酸、エネルギー源等を選択して、添加する。さらに所望により、無細胞タンパク質合成系の反応効率を高める物質、例えば各種イオン化合物、好ましくはカリウムイオン化合物、マグネシウムイオン化合物等を添加することができる。これらのイオン化合物の濃度は、用いる鋳型 mRNA 種に応じて、至適濃度を選択する。さらに、溶解性を高める物質例えば界面活性剤、前記リボソームの脱アデニン化を防御する物質等を、所望により添加することができる。また、反応温度は、鋳型 mRNA 種に応じて至適温度を選択する。

【0023】

（各要素の追加添加）

本発明においては、反応開始後、要時又は継続的に、合成反応の鋳型となる mRNA を、原料として添加した mRNA の鋳型活性が低下傾向を示す前後に追加する。追加は、所望により、極少量を継続的に添加してもよいし、一定期ごとに追加してもよい。添加量は、原料 mRNA 量の 10 分の 1 から同量程度である。この発明の特徴は、追加添加の効果をはじめて確認したことにより、添加量、追加時期については、合成効果の確認をもって、当業者が容易に変更・特定可能である。なお、他の要素についても同様であり、以下の記載で特に記述されていなくても同様の意味である。

【0024】

本発明においては、反応開始後、要時又は継続的に、エネルギー再生系酵素を、原料として添加したエネルギー再生系酵素活性が低下傾向を示す前後に追加す

る。添加は、所望により、極少量を継続的に添加してもよいし、一定期ごとに添加してもよい。添加量は、原料エネルギー再生系酵素量の10分の1から同量程度である。エネルギー再生系酵素としては、クレアチンキナーゼが適当である。無論、本化合物と同様の機能を有する物質は同様にエネルギー再生系酵素として添加できる。その添加量・添加方法は、合成量をマーカーにして、要時変更可能である。

【0025】

mRNAの追加添加とエネルギー再生系酵素の追加添加は、別々に行ってもよいがより好ましくは併用される。添加方法も、継続的あるいは断続的に行ってもよい。その添加量・添加方法は、合成量を指標にして、要時変更可能である。

【0026】

本発明は、前記mRNAの追加添加及び／又はエネルギー再生系酵素の追加添加に加えて、所望により、基質及び／又はエネルギー源が枯渇することを防ぐ工程、及び／又は副生成物を排出する工程を導入することが出来る。基質、エネルギーとしては、各種アミノ酸、ATP、GTPなどが連続的に又は断続的に追加供給されることが好ましい。その添加量としては、合成開始時の各物質の濃度あるいはほぼそれに近い濃度が維持されることが好ましい。しかし、この添加量もまた、合成効果を指標にして要時、追加、変更可能である。

【0027】

副生成物を排出するとは、AMPやGMP等の代謝産物及びリン酸やピロリン酸等の反応物を排出することであり、このような化合物は、継続的に又は断続的に反応系から排出されることが好ましい。

【0028】

基質及び／又はエネルギー源が枯渇することを防ぐ工程、及び／又は副生成物を排出する工程としては、反応系の反応媒体を継続的又は断続的に、更新していくことが好ましい。本発明では、例えば、透析膜を使う方法を例示するが、その場合例えば透析外液を継続的又は断続的に更新又は交換していく。

【0029】

以上のような各要素の追加・保存・交換・排出は、好ましくは自動化して処理

する。自動化の手段は、自体公知のコンピュータシステムの制御下にある装置を準備し、各要素の追加・保存・交換・排出を一体化して行う。これらに、使用する各要素としての試薬類はキット化して調製されていることが好ましい。

【0030】

(自動連続無細胞タンパク質合成装置)

自動連続無細胞タンパク質合成装置は自体公知のコンピュータシステムの制御下にあり、各要素の追加・保存・交換・排出を一体化して行う機能に加えて、タンパク質合成に最も至適な環境を設定できる機能を併せ持つ。

【0031】

すなわち、複数の透析容器を、例えば15度摂氏より37度摂氏まで温度可変可能なそれぞれ独立した複数の、電子冷却装置とヒーターとからなるチャンバーに入れることで所望の温度に設定でき、目的とするタンパク質の合成に最も至適な温度を維持することができる。

【0032】

また、透析容器の透析外液を継続的又は断続的に更新又は交換していく方法として、例えば連続可変若しくは断続的にペリスターポンプ若しくはシリンジポンプ等の分注装置を用い、透析外液の更新又は交換の速度を例えば、0.1～1 mL/時間の間で可変とすることにより、目的とするタンパク質の合成に最も至適な条件を選定することができる。

【0033】

さらに、鋳型mRNA及びエネルギー再生系酵素であるクレアチンキナーゼ等のタンパク質合成に必要な物質を、複数の透析容器中に設置されるタンパク質合成反応系部分に、所望の時間毎に、例えば6時間～15時間の間隔を置いて、所望の量を追加添加できる。

【0034】

上記装置において、鋳型mRNA、エネルギー再生系酵素基質、エネルギー源、透析外液等の各要素は、個別に又は混合されて、透析容器に接続された貯蔵容器に保存され、貯蔵容器とタンパク質合成反応系部分又は透析容器とを連結する流路を通して供給される。この貯蔵容器は好ましくは4度摂氏に維持される。

【0035】

(連続無細胞タンパク質合成装置の構成)

本発明の具体化のための連続無細胞タンパク質合成系に使用する装置の一例として、カートリッジ装置を説明する。但し、本発明の装置は、必ずしもカートリッジ式である必要はない。

【0036】

カートリッジ装置は、一般に有底中空体である含浸槽とこれに密封可能に装着される蓋部とを含む構成からなる連続無細胞タンパク質合成装置である。該装置は基質及び／又はエネルギー源の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室につながる出口をもつ流路、透析外液中の代謝産物等の排出手段である含浸槽内の液室に存する入口と外部につながる出口をもつ流路、mRNA及び／又はエネルギー再生系酵素の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室に存する透析膜の機能を有する媒体を担持する。

【0037】

図1はカートリッジ装置の斜視図であり、図2はカートリッジ装置の中央断面図である。以下、図をもって本発明のカートリッジ装置を詳細に説明するが、図示した装置は実施の一態様であり、これに限定されるものではない。

【0038】

カートリッジ装置は、一般に有底中空体である含浸槽1とこれに密封可能に装着される蓋部2を含み、含浸槽1内には透析外液3が液面4まで満たされる。さらに詳しくは、エネルギー源等の導入手段である入口5と透析外液3の含浸槽1内の液室につながる出口6をもつ流路7、透析外液3中の代謝産物等の排出手段である含浸槽1内の液室に存する入口8と外部につながる出口9及び／又は9aをもつ流路10、及び合成系物質の導入手段である入口11と透析外液3の含浸槽1内の液室に存する透析膜の機能を有する媒体12を基本的な構成として担持する。実施の一態様として、図1及び2には含浸槽が円筒体であるカートリッジ装置を示したが、含浸槽の形は円筒体に限らない。

【0039】

ここにおいて、出口6は、透析外液3と液中において連絡しており、出口6の

端部は、含浸槽 1 の上半分に位置し、少なくとも液面 4 より下部に位置する。入口 8 は、透析外液 3 と液中において連絡しており、入口 8 の端部は、含浸槽 1 の下半分に位置する。出口 6 の端部の位置と入口 8 の端部の位置は、上下が逆転していても良い。

【0040】

出口 9 a と導入部 20 a は、液面 4 と同部位に接しかつ液面 4 より上部に位置する。出口 9 a と導入部 20 a により、排出は自然流出が可能となる。なお、透析外液 3 中の代謝産物等の排出を出口 9 とその導入部 20 を介して行う場合は、出口 9 a とその導入部 20 a を閉鎖するか、あるいは成形時に出口 9 a とその導入部 20 a を付加しないで成形したものを使用することもできる。また、透析外液 3 中の代謝産物等の排出を出口 9 a とその導入部 20 a を介して自然排出する場合は、出口 9 とその導入部 20 を閉鎖するか、あるいは成形時に出口 9 と導入部 20 を付加しないで成形したものを使用することもできる。さらにこの場合、図示していないが、出口 9 a の導入部 20 a と入口 8 の導入部 19 とが接続可能になるように、導入部 19 及び導入部 20 a を成形して使用することもできる。この成形時、入口 8 の導入部 19 は、出口 9 側の端部を蓋部に接続せず、出口 9 a の導入部 20 a に接続可能なように成形しても良い。

【0041】

透析膜機能を有する媒体 12 は、入口 11 の導入部 13 と一体成形されていてもよいが、例示するように留め具 14 によって、固接されていてもよい。媒体 12 は、少なくとも透析外液 3 中に浸漬されるように含浸槽 1 内に位置付けて設置される。媒体 12 の入口 11 につながる方向とは逆の端部は、少なくとも透析外液 3 中に浸漬されるように含浸槽 1 内に位置付けて設置され、少なくとも閉鎖されておれば十分であり、一具体例としては、膜端部 15 のように蓋形状のものによって閉鎖するか、又は媒体 12 を口部が一つの袋状のものとして用いてもよい。

【0042】

カートリッジ装置には、好ましくは透析外液 3 の攪拌をする手段を導入してもよい。一具体例としては、マグネティックスターラー 16 のような回転媒体を含

浸槽 1 内においてもよい。

【0043】

含浸槽 1 は、恒温化を施すことが、合成効率のためには好ましく、所望の恒温化手段との併用が可能である。例えば、恒温槽に設置可能なように、含浸槽 1 は調整できる。カートリッジ装置は、通常は透析外液 3 及び合成系物質が浸漬のない状態で使用者に提供され、使用者が所望により随時入口 11、入口 5 から各々流入させることによって浸漬される。

【0044】

入口 5、出口 9、入口 11 は、その流出入について自動化制御する手段が導入されることが好ましい。但し、より簡易な自動化手段としては、入口 5 から出口 6、そして入口 8 から出口 9 の流出入系が液面 4 を一定に保つべく自動制御されていることが好ましい。この場合、入口 11 からの物質の追加添加は、手動制御により行ってもよい。また、出口 9 a 及び導入部 20 a が、液面 4 より上部であってかつ液面に接した部位に設置された場合には、自然流出が可能である。

【0045】

本カートリッジ装置は、事前組立て装置であってもよいし、要時組立ての装置であってもよい。要時組立ての場合は、含浸槽 1、1 の蓋部 2、入口 11 の導入部 13、入口 5 の導入部 17、出口 6 の導入部 18、入口 8 の導入部 19、出口 9 の導入部 20、媒体 12（導入部 13 と事前成形してもよい）を個々に用意し、各々の接続は、例えばテーパー手段によって行う。

【0046】

カートリッジ装置の材質は、広く公知のプラスチック材料が利用できる。

【0047】

【実施例】

以下、本発明をコムギ胚芽抽出物を使用した無細胞タンパク質合成系を用いた参考例、実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の参考例、実施例により何ら限定されるものではない。

【0048】

【参考例 1】

コムギ胚芽抽出物の調製

ミル、浮選、篩を用いる種子から無傷（発芽能を有する）の単離方法は J o h n s t o n らの方法（J o h n s t o n, F. B. e t a l. (1957), N a t u r e, 179, 160-161）を改良して用いた。まず、コムギ種子を 1 分間に 100 g の割合でミル（F r i t s c h 社製 R o t o r S p e e d M i l l p u l v e r i s e t t e 14 型）に添加し、回転数 8, 000 r p m で種子を温和に破碎した。これを再度 6, 000 r p m で破碎し、篩で粗胚芽画分（メッシュサイズ 0.71 mm ~ 1.00 mm）を得た後、四塩化炭素とシクロヘキサン混液（四塩化炭素：シクロヘキサン = 2.5 : 1）を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を浮上面分から回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した。

【0049】

この胚芽画分に混在する種皮等の不純物をポリエチレン板などの静電気帯電体を用いて吸着除去した。さらに胚芽粒子を篩と静電気帯電体を用いて、小粒（0.71 mm ~ 0.85 mm）、中粒（0.85 mm ~ 1 mm）、軽粒（0.85 mm ~ 1 mm でかつ軽量）の 3 画分に分別し、最後に目による分別を行った。小粒画分が最も高いタンパク質合成活性を示した。軽粒は、種子破碎時に胚芽に生じた小傷胚芽が浮選操作中に破壊が進行したものであると推察される。次に、この試料からコムギ胚乳成分を完全に除去するため、ガーゼにコムギ胚芽を入れ、冷却しながら冷蒸留水（D D W）で洗浄し、非イオン性界面活性剤である N P - 40 の 0.5 % 溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄を繰り返した。蒸留水の存在下に再度 1 回の超音波洗浄後、吸引ろ過によってコムギ胚芽をとり、それを冷蒸留水（D D W）で何度も洗浄し、コムギ胚芽を純化した。

【0050】

コムギ胚芽抽出物の調製は常法（E r i c k s o n, A. H. e t a l. (1996), M e t h. i n E n z y m o l., 96, 38-50）に準じた。以下の操作は 4 度摂氏で行う。液体窒素で凍結した純化コムギ胚芽を乳鉢

中で粉碎し、得た粉体1g当たり、1mlのPattersonらの方法を一部改変した抽出溶液（80mM HEPES-KOH pH7.8、200mM 酢酸カリウム、2mM 酢酸マグネシウム、4mM 塩化カルシウム、8mM ジチオスレイトール、各0.6mM L型アミノ酸20種類、各1μMのタンパク質分解酵素阻害剤であるFUT、E-64、PMSFを含む）を加えて、泡が発生しないように注意しながら攪拌した。

【0051】

30,000×g、15分間の遠心によって得られる上清を胚芽抽出物として回収し、あらかじめ溶液（40mM HEPES-KOH pH7.8、100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、4mM ジチオスレイトール）で平衡化しておいたセファデックスG-25カラム（Coarse）でゲル濾過を行った。試料の濃度を、170～250A260nm（A260/A280=1.5）に調製した。

【0052】

【参考例2】

無細胞タンパク質合成反応液の調製

無細胞タンパク質合成反応液は、上記の方法で調製したコムギ胚芽抽出物を容量の20～60%含み、Ericssonらの方法に準じた以下の成分組成である、30mM HEPES-KOH pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、2.85mM ジチオスレイトール、0.5mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸（各0.3mM）、0.05% NP-40を添加することにより調製した。この反応液に、既に報告した方法（Endo, Y. et al. (1992), J. Biotech., 25, 221-230）で調製したCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素（dihydrofolate reductase）をコードするmRNA（80μg/ml反応容量）を添加した。

【0053】

【実施例1】

mRNA及びクレアチンキナーゼの追加による反応維持時間の延長による合成の効率化

モデルとしてジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAを用い、24時間合成反応を行った。反応溶液は、容量の48%のコムギ胚芽抽出物を含み、上記 Ericksonらの方法に準じた以下の成分組成である、1,000 units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤 (RNasin)、30 mM HEPES-KOH pH 7.6、95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.85 mM ジチオスレイトール、0.5 mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2 mM アデノシン-三リン酸 (ATP)、0.25 mM グアノシン-三リン酸 (GTP)、16 mM クレアチンリン酸、0.380 mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3 mM)、0.05% NP-40の他、既に報告した方法 (Endo, Y. et al. (1992), J. Biotech., 25, 221-230) で調製したCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase) をコードする mRNA (80 μ g/ml 反応容量) を含む。

【0054】

反応溶液を、その20倍容量の透析外液 (20 mM HEPES-KOH pH 7.6、95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、4 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.380 mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3 mM)、0.005% アジ化ナトリウム、0.05% NP-40、E-64、PMSF各1 mM) に対する透析系を用いて、23度摂氏で反応させた。

【0055】

反応開始12時間後に、1 mlの反応容量当たり20 μ gのCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAと、1 mlの反応容量当たり200 μ gのクレアチンキナーゼとを追加添加、又は1 mlの反応容量当たり20 μ gのCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAのみを追加添加、若しくは1 mlの反応容量当たり200 μ gのクレアチンキナーゼのみを追加添加した

。比較対照として、両物質とも追加添加せず、反応を行った。操作は手動で行い、透析外液の交換はしなかった。合成タンパク質量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、タンパク質をクマシーブルー染色し、デンストメーターを用いてその染色バンド強度と標準品との比から求めた(Endo, Y. et al. (1992), J. Biotech., 25, 221-230, Endo, Y. et al. (1975), Biochim. Biophys. Acta, 383, 305-315)。

【0056】

図3に示すように、反応開始12時間後(矢印)におけるmRNA及びクレアチンキナーゼの追加添加(○-○)によって合成反応がほぼ直線的に持続することがわかる。いずれか一方のみの追加添加(△-△)(▽-▽)では、追加添加しない(□-□)と同様に反応が停止した。すなわち、上記で示した可能性(mRNAの鋳型活性低下と、クレアチンキナーゼ活性の低下によるエネルギー源の枯渇とに起因するタンパク質合成反応の停止)がここで実験的に確認され、その解決方法も完成した。

【0057】

【実施例2】

透析外液の経時的交換による反応維持時間の延長による合成の効率化

モデルとしてジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAを用い、反応液組成、温度等の条件は実施例1と同様とし、反応開始後24時間及び45時間に透析外液を交換して、60時間タンパク質合成を行った。比較対照として、透析外液を交換しないでタンパク質合成を行った。いずれの反応系にも、1mlの反応容量当たり20 μ gのCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAと、1mlの反応容量当たり200 μ gのクレアチンキナーゼとを追加添加した。合成タンパク質量は実施例1に記載した方法によって測定した。

【0058】

図4に示すように、透析外液交換なし(△-△)では24時間までほぼ直線的に合成が進行するものの、30時間程度で反応速度が極端に低下する。しかし、24時間毎(矢印)に透析外液を交換することにより(○-○)、タンパク質合

成が少なくとも60時間まで持続した。すなわち、上記で示した可能性（タンパク質合成に必須な原料の枯渇と副生成物の蓄積によるタンパク質合成反応の停止）がここで実験的に確認され、その解決方法も完成した。

【0059】

【実施例3】

自動連続無細胞タンパク質合成装置を用いたmRNA及びクレアチンキナーゼの自動追加及び透析外液の自動交換による、反応維持時間の延長と合成の効率化

モデルとしてジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAを用い、反応液組成、温度等の条件は実施例1と同様とし、自動連続無細胞タンパク質合成装置を用いてタンパク質合成を60時間行った。反応開始12時間毎に、別々に4度摂氏に保存しておいた1ml反応容量当たり20 μ gのCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNA及び1ml反応容量当たり200 μ gのクレアチンキナーゼを、それぞれ5 μ lずつ追加添加して反応させた。透析外液は、4度摂氏に維持した貯蔵容器から、透析容器に連続的に供給（0.3ml/時間）し、同流速で透析容器から排出させた。開始反応溶液量（0.5ml）に対して1 μ l相当量の反応溶液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、タンパク質をクマシーブルー染色した（図5（A））。比較対照として、CAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAを追加添加せずクレアチンキナーゼのみを追加添加し、上記同様の方法でタンパク合成を行った（図5（B））。また、反応0時間の試料1 μ lにジヒドロ葉酸還元酵素標品1 μ gを添加して同様に泳動・染色した（図5（A）右レーン）。合成タンパク質量は実施例1に記載した方法で測定した（図5（C））。

【0060】

図5に示すように、CAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAを追加添加せずクレアチンキナーゼのみを追加添加した（ Δ - Δ ）場合、反応が15時間程度で停止した。図示していないが、クレアチンキナーゼを追加せずCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAのみを追加添加した場合にも同様に反応の停止が観察された。一方、12時間毎のCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNA及びクレアチンキナーゼの自動追加と24時

間目の透析外液の自動交換（○－○）とによって、無細胞タンパク質合成が自動的に効率よく進行した。すなわち、本装置が有効に機能していることが確認できた。

【 0 0 6 1 】

【発明の効果】

既に特許出願中の無細胞タンパク質合成反応方法と本願に示した合成方法の検討によって得た原理を基に、透析式の自動連続タンパク質合成装置が発明され、タンパク質の合成が簡便化された。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

カートリッジ装置の斜視図である。

【図 2】

カートリッジ装置の中央断面図である。

【図 3】

mRNA 及びクレアチンキナーゼの追加添加によるタンパク質の合成効果の維持を示した図である。

○－○はCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードする mRNA とクレアチンキナーゼを追加添加、△－△は mRNA のみを追加添加、▽－▽はクレアチンキナーゼのみを追加添加、□－□は追加添加せず、矢印は追加添加時を示す。

【図 4】

透析外液の交換によるタンパク質の合成効果の維持を示した図であり、○－○は透析外液の交換をしたもの、△－△は交換しなかったもの、矢印は交換時を示す。

【図 5】

自動化装置によるタンパク質の合成効果の維持を示した図である。

○－○はCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードする mRNA とクレアチンキナーゼを追加添加、△－△は mRNA を追加添加しなかったものを示し、白矢印は合成産物であるジヒドロ葉酸還元酵素を、また★印は追加したクレアチンキナーゼの染色バンドを示す。

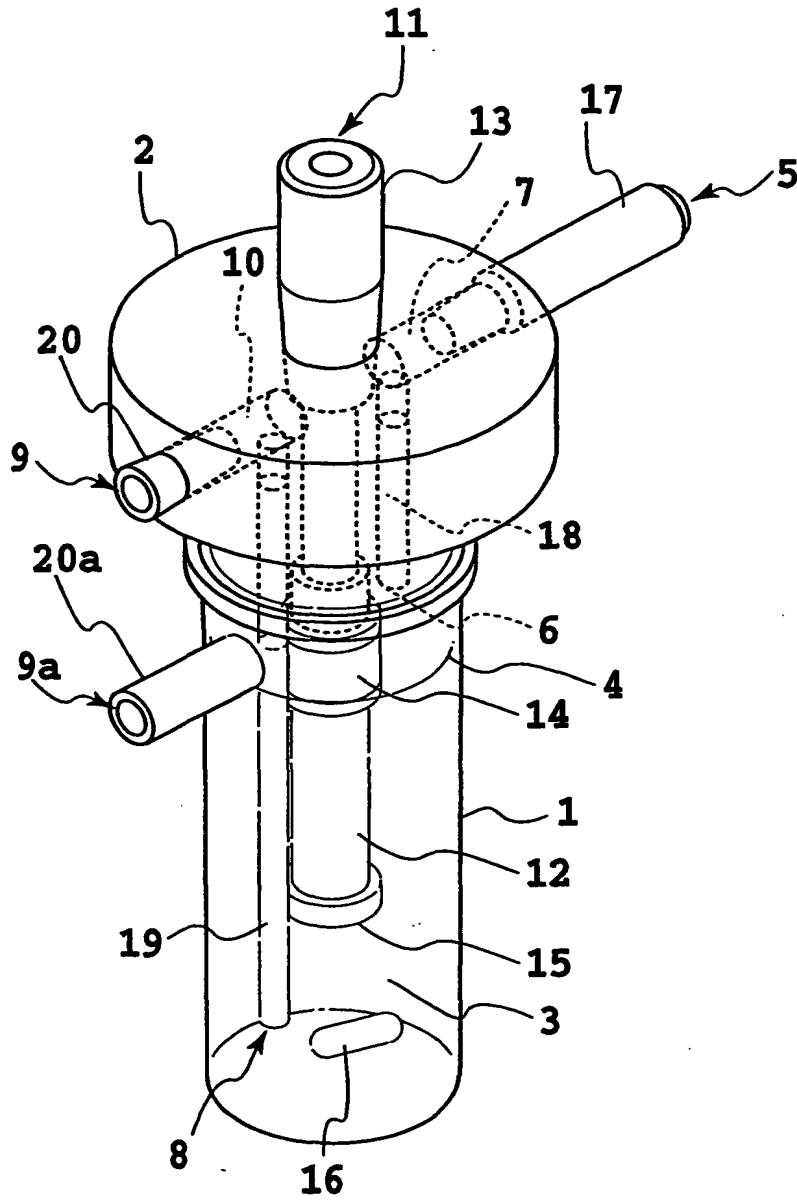
【符号の説明】

- 1 含浸槽
- 2 蓋部
- 3 透析外液
- 4 透析外液の液面
- 5 基質及び／又はエネルギー源等供給用の導入口
- 6 基質及び／又はエネルギー源等供給用の含浸槽内出口
- 7 流路
- 8 透析外液排出用の含浸槽内導入口
- 9 透析外液排出用の外部排出口
- 9 a 透析外液排出用の外部排出口
- 1 0 流路
- 1 1 m R N A 及び／又はエネルギー再生系酵素供給用の導入口
- 1 2 透析膜機能を有する媒体
- 1 3 導入口 1 1 の導入部
- 1 4 膜留具
- 1 5 膜端部
- 1 6 マグネティックスターラー
- 1 7 導入口 5 の導入部
- 1 8 含浸槽内出口 6 の導入部
- 1 9 含浸槽内導入口 8 の導入部
- 2 0 外部排出口 9 の導入部
- 2 0 a 外部排出口 9 a の導入部

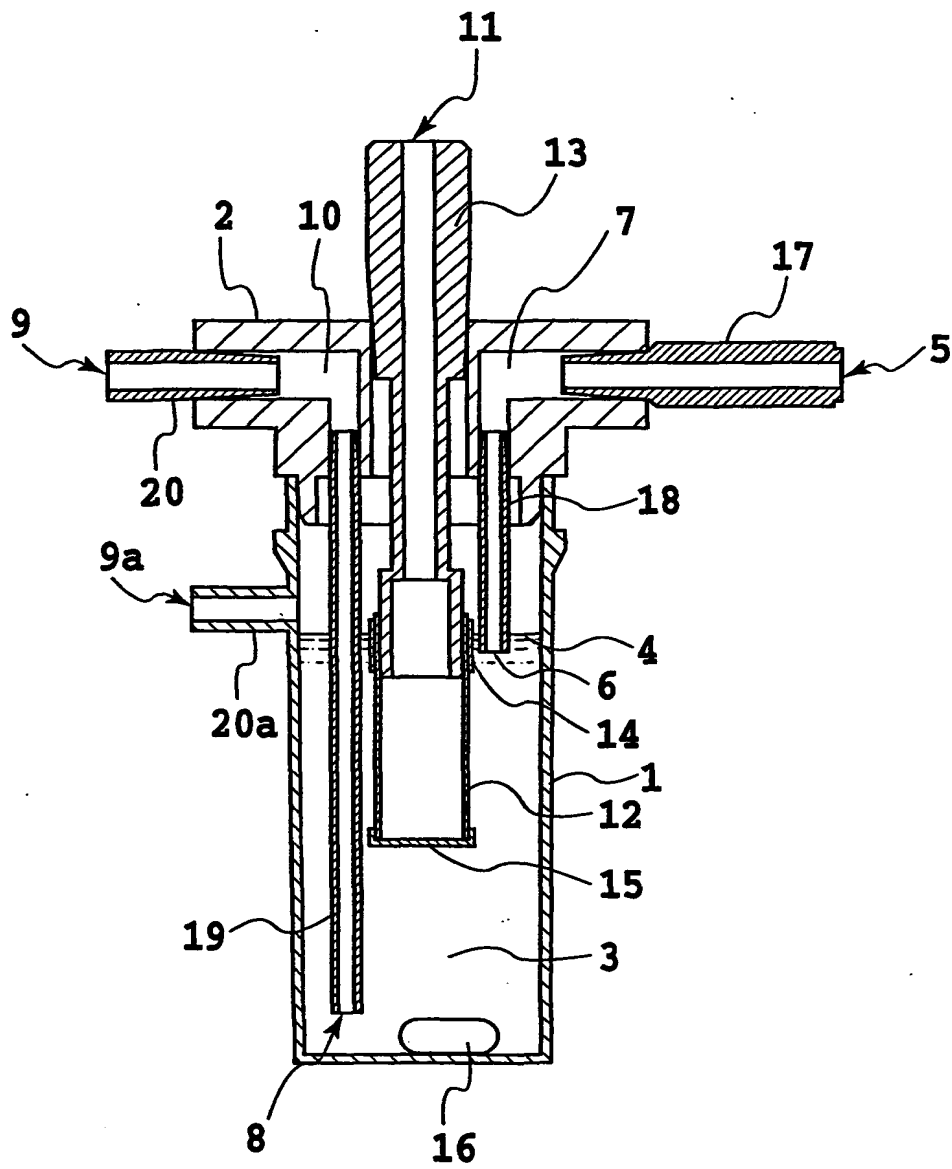
【書類名】

図面

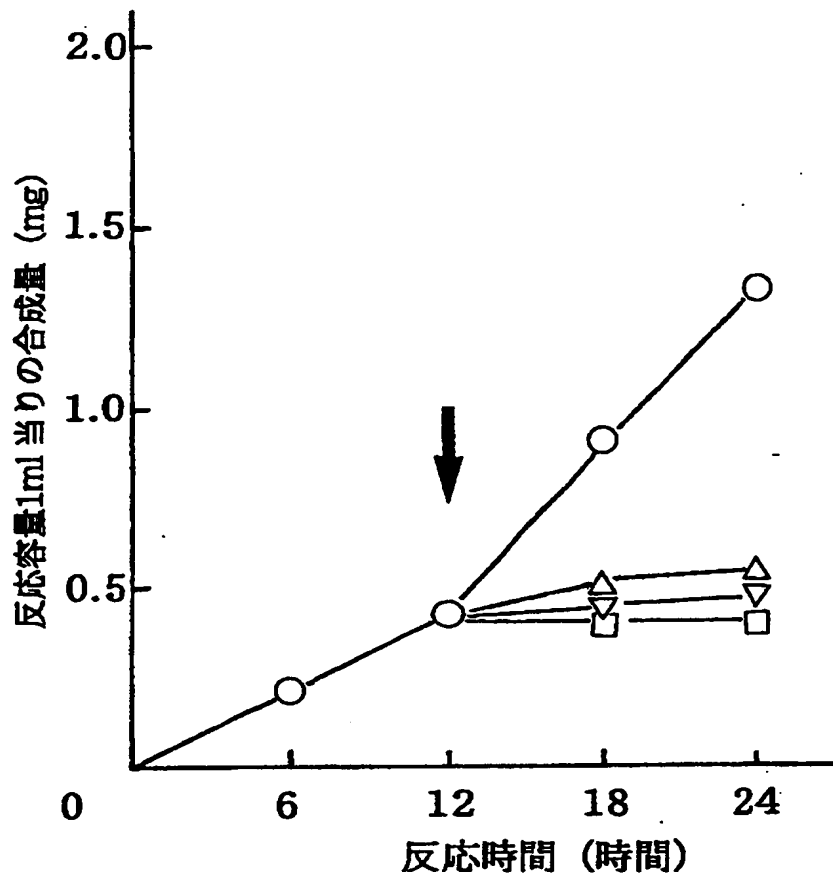
【図 1】



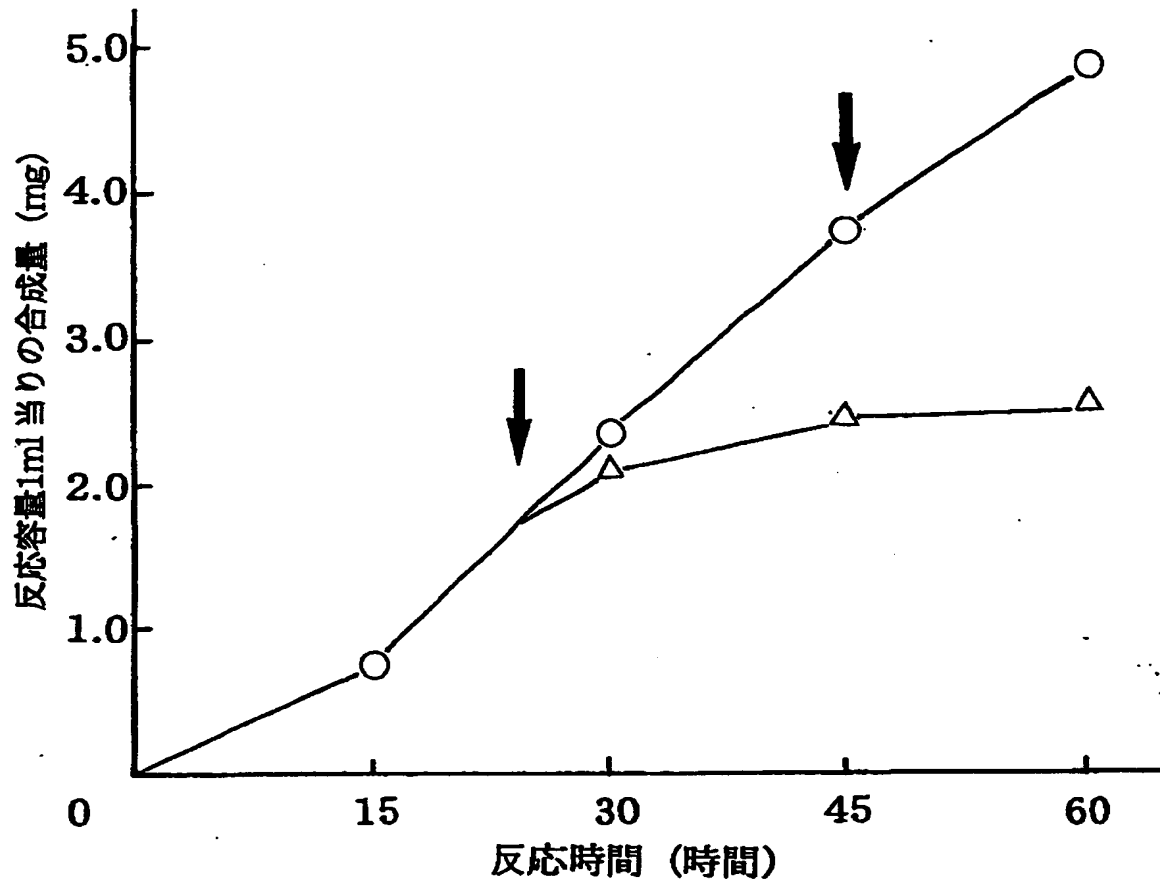
【図 2】



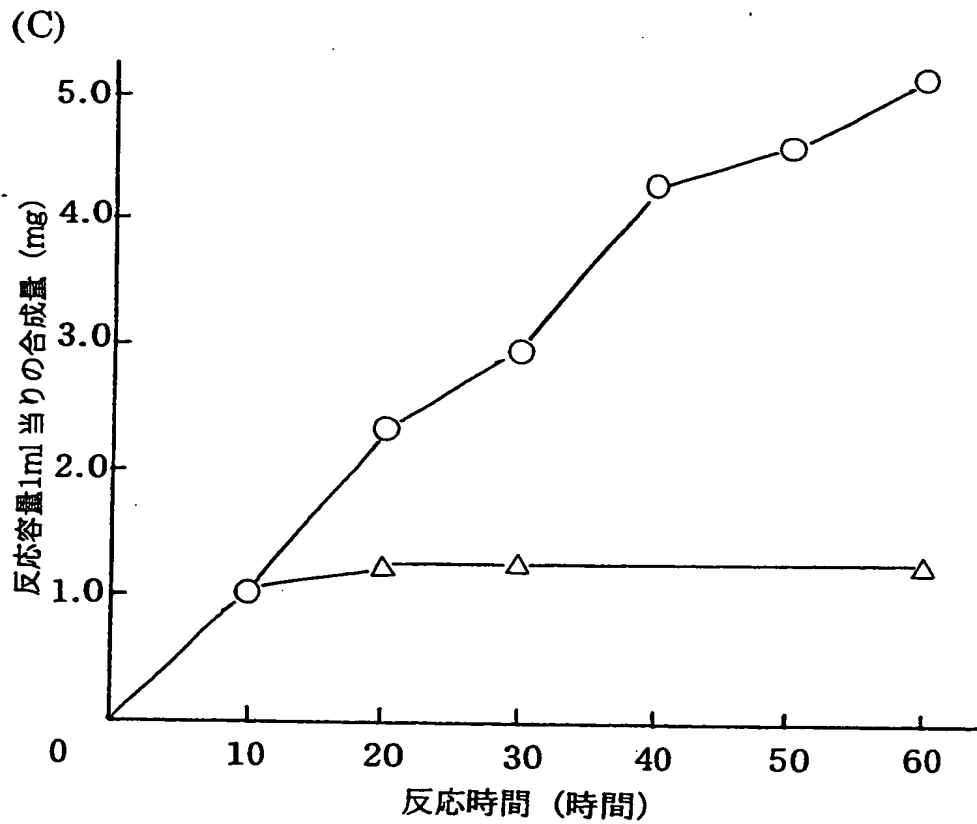
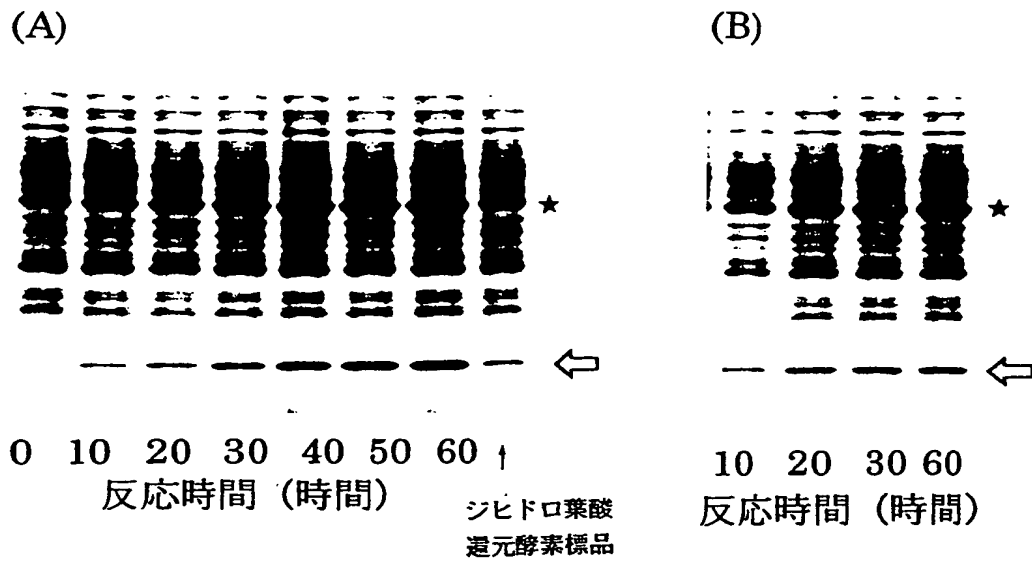
【図3】



【図 4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 本発明は、効率的な連続無細胞タンパク質合成手段を提供することを目的とする。

【構成】 本発明は、自己のタンパク質合成反応の阻害物質が実質的に排除された細胞抽出液からなる無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鑄型となる mRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入することを特徴とする連続無細胞タンパク質合成手段からなる。

【選択図】 図 5

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第151599号
受付番号	59900506170
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年 6月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 5月31日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591106680]

1. 変更年月日 1991年 4月18日
[変更理由] 新規登録
住 所 京都府京都市左京区北白川西伊織町25番地
氏 名 和研薬株式会社